

明治大学農学部研究報告 第65巻－第1号 (2015) 1～7

〔総 説〕

G-protein-coupled receptor 4 受容体のリガンド及び機能

大嶋 菜月¹⁾・根岸 潤²⁾・戸村 秀明^{1)2)3)*}

(2014年9月16日受理)

The ligands and functions of G-protein-coupled receptor 4

Natsuki OSHIMA¹⁾, Jun NEGISHI²⁾ and Hideaki TOMURA^{1)2)3)*}

Abstract

Multicellular organisms have developed receptor proteins which sense various internal and external stimuli such as light, odorants, neurotransmitters and hormones. Among the receptors, G-protein-coupled receptors (GPCRs) sense these stimuli and mediate these stimuli through trimeric G proteins. G-protein-coupled receptor 4 (GPR4) is a GPCR and has been shown to be activated by lipids as ligands, such as lysophosphatidylcholine (LPC) and sphingosylphosphorylcholine (SPC). On the other hand, GPR4 has recently been identified as a proton-sensing GPCR which senses extracellular protons. In this review, we summarize the GPR4 research background, especially regarding ligands and its functions.

要 旨 7回膜貫通型受容体であるGタンパク質共役型受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)は、生体内外の刺激を感知し、三量体Gタンパク質を介してその情報を細胞内に伝える。GPCRの一種であるG-protein-coupled receptor 4 (GPR4)は、lysophosphatidylcholine (LPC)やsphingosylphosphorylcholine (SPC)といった脂質により活性化する受容体であるとの報告が、最初になされた。しかしながらその後、この受容体が細胞外pHを感知するプロトン感知性受容体でもあるとの報告がなされ、その機能が注目されている。このようにGPR4は脂質やプロトンによってその活性化が調節されるユニークなGPCRである。本稿では、GPR4のリガンドやその機能を中心に、その研究の現状を紹介する。

キーワード : Gタンパク質共役型受容体, プロトン感知性受容体, GPR4, Lysophosphatidylcholine, Sphingosylphosphorylcholine

1. はじめに

ヒトの身体は約60兆個の細胞から構成されている。生命活動を維持するためには、これらの細胞が生

体内外からの刺激に適切に反応し、応答する必要がある。そのために生物は多種多様な刺激を感知する受容体を発達させてきた。

受容体の中でGタンパク質共役型受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)は、細胞膜を7回貫通する特徴を持つ受容体群である。GPCRは酵母からヒトまで保存されており、ヒトでは約800種類のGPCRの存在がゲノム解析により示唆されている。各々のGPCRは、特定の刺激にのみ反応する。また

¹⁾ 明治大学農学研究科 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1

²⁾ 明治大学農学部 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1

³⁾ 明治大学生殖内分泌学研究所 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1

* Email: tomurah@meiji.ac.jp;

TEL: 044-934-7825; FAX: 044-934-7825

GPCR は、光、匂い、味、ホルモン、オータコイドなど、多種多様な刺激を認識し、生命活動を調節していることから、GPCR は創薬の標的としても注目されてきた。現在、臨床で用いられている臨床薬の約3割が GPCR を標的としているといわれている (大嶋 *et al*, 2014)。

GPCR は主に膜貫通部分のアミノ酸配列の相同性から、6 種類にクラスに一般に分類される (Fredriksson *et al*, 2003)。G-protein-coupled receptor 4 (GPR4) はこのうちロドプシンクラスに属する。このクラスには、光、匂い、神経伝達物質他さまざまな刺激を受け取る GPCR が含まれ、GPCR クラスの中で最大数の GPCR が存在している。一方これとは別に、GPCR の活性化様式の違いで GPCR を分類することも行われている。GPR4 は受容する刺激が特殊なため、その活性化様式は後述するようにいままでのどの GPCR の活性化様式とも異なるユニークなものとなっている。また GPR4 は広範な組織にその発現が確認されており (Xu, 2002), GPR4 が生体機能の調節、維持に重要な役割を担っていることが予想される。このように GPR4 は、受容する刺激が特殊であることやユニークな活性化様式を示すことから、その生理学的、病態生理学的な役割を解明することは、単に新たな生体調節系を明らかにするだけでなく、GPR4 を標的とした今後の創薬発展に一助を成す可能性もある。本稿では GPR4 の研究の現状について紹介する。

2. GPCR のシグナル伝達様式

GPCR は外部からの刺激を受け取った後、 α , β , γ の3種類のサブユニットで構成される三量体 G タンパク質の活性化を介して、各種酵素やイオンチャンネルの活性を制御することで、遺伝子発現、増殖、ホルモンやサイトカインなど生理活性物質の分泌、細胞遊走など、各種の細胞応答を制御している。 α サブユニットのアミノ酸配列の相同性と機能から三量体 G タンパク質は、 G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, 及び $G_{12/13}$ の4種のサブファミリーに大別される。GPCR が共役する α サブユニットや $\beta\gamma$ サブユニットの種類により、活性

が制御される各種酵素やイオンチャンネルは異なる (Katada, 2012)。各種酵素やイオンチャンネルの活性が制御されることで、低分子量 G タンパク質の活性化や cAMP, cGMP, diacylglycerol, inositol triphosphate, アラキドン酸, ナトリウムイオン, カリウムイオン, カルシウムイオンなどの細胞内濃度が変化する結果、上記のような細胞応答が引き起こされる (Dong *et al*, 2013; Ren *et al*, 2014; Svoboda *et al*, 2004)。

3. GPR4 の活性調節

3.1. SPC, LPC による GPR4 の活性調節

GPR4 は, lysophosphatidylcholine (LPC) や sphingosylphosphorylcholine (SPC) といった脂質をリガンドとする受容体として最初に報告された (Xu, 2002)。しかしながら、LPC や SPC の GPR4 への直接的な結合が再現されなかったために、これらの脂質が GPR4 の直接のリガンドであるとの報告は撤回されたが、その後、別のグループから LPC, SPC をリガンドとする報告が出されている (Huang *et al*, 2007; Kim *et al*, 2005; Qiao *et al*, 2006; Zou *et al*, 2007)。SPC, LPC がどのようにして GPR4 の活性化に関与しているのか、その活性化機構は現在不明である。GPR4 とアミノ酸相同性の高い G2A に関しては、LPC が G2A を細胞膜に安定して発現させる結果、G2A の活性化に寄与するとの報告がなされている (Wang *et al*, 2005)。LPC や SPC による GPR4 の活性化も同様の機構で起こっている可能性がある。

3.2. プロトンによる GPR4 の活性調節

GPR4 の過剰発現により、EGF 刺激などによる extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化が、SPC, LPC が存在しない状態で抑制されることが報告され、GPR4 は恒常的に活性化している受容体であると、一時考えられた (Bektas *et al*, 2003)。しかしながら2003年に Ludwig らによって、ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1), GPR4 が細胞外 pH により活性化されるプロトン感知性受容体であるとの報告がなされた (Ludwig *et al*,

2003)。この報告によれば、これらの受容体は生理的 pH である pH 7.4ですでに部分的に活性化されている。すなわち Bektas らの報告にある GPR4 による ERK1/2 の抑制は、メディウム中（～pH 7.4）のプロトンによる GPR4 活性化の結果と解釈できる (Tobo *et al*, 2007)。現在までに OGR1, GPR4 と同じサブファミリー内に属する TDAG8 (Ishii *et al*, 2005; Wang *et al*, 2004), G2A (Murakami *et al*, 2004) も酸性化に伴い活性化されるとの報告がなされている。GPR4 の発現は広範な組織に認められるが、OGR1, TDAG8, G2A とは異なり、血管内皮細胞に特に高いその発現が観察される。動脈硬化巣では LPC が高濃度に含まれていることに加えて pH が低下していることや、血管新生を呼び込むがん組織では pH が低下していることから、GPR4 のこれら病態に対する役割が注目されている。このような理由により、後述するように、GPR4 の機能解析は、主に血管機能やがんの増殖・転移能に対して、行われてきた。プロトン感知性受容体の活性化様式は、受容体内の細胞外に位置するヒスチジンがプロトン化されることで、構造変化を起こすことによるものとされている (Liu *et al*, 2010; Ludwig *et al*, 2003; Wang *et al*, 2004)。GPR4 においてもプロトンの感知に関与するヒスチジンの解析が行われ、受容体の細胞外側に存在する 3 つのヒスチジン、すなわち N 末から 79 位のヒスチジン、165 位のヒスチジン、269 位のヒスチジンがプロトンの感知に関与することが明らかとなっている (Liu *et al*, 2010)。GPCR がある刺激分子を特異的に受容し活性化する様式は、酵素が特異的な基質を認識し活性化する様式と似ている。すなわち「かぎ」であるホルモンなどの刺激分子の形に対応した特異的な「かぎ穴」構造をもつ GPCR が、その刺激分子と特異的に結合する。するとその GPCR は活性化型に変化し細胞内にシグナルを伝達することで、増殖、遊走、分泌など多様な細胞応答を引き起こす。アドレナリンなどの低分子の刺激分子は、主に GPCR の内部深くに存在する「かぎ穴」に結合することで GPCR を活性化型に変化させる (図 1, A)。ペプチドホルモンなどの比較的高分子の刺激分子は、GPCR の N 末と GPCR の細胞表

面部分で構成される「かぎ穴」に結合することで、GPCR を活性化型に変化させる (図 1, B)。変わったものとしてはトロンビンによる GPCR の活性化があげられる。トロンビンは血液凝固反応に関与するプロテアーゼの一種である。トロンビンにより活性化する GPCR は、トロンビンが GPCR に結合することによって活性化されるのではない。トロンビンは GPCR の N 末端部分を切断することで、GPCR の新たな N 末端部分を露出させる。この新たな N 末端部分が刺激分子としてこの受容体に結合することで、GPCR を活性化型に変化させる (図 1, C)。プロトンによる GPR4 の活性化は、このどの様式にも合わない。図 1 の D に示すように細胞外 pH の低下に伴い増加したプロトンが、GPR4 の細胞外に存在する特異的なヒスチジン残基同士の水素結合を切断すると、GPCR の立体構造が変化し自動的に活性化型になる。すなわち GPR4 の活性化には刺激分子の結合は関与せず、自動的に受容体が活性化するのである。これはいままでのどの GPCR にもないユニークな活性化様式となっている。細胞外プロトンにより活性化した GPR4 は、G_s/adenylylcyclase (AC)/cAMP 系に共役することが最初に報告 (Ludwig *et al*, 2003)されたが、その後、図 2 に示すように、G_{12/13}/Rho 経路、G_{q/11}/phospholipase C/inositol trisphosphate/Ca²⁺ 経路にも共役しうる多機能性のプロトン感知性受容体であるとの報告がなされている (Liu *et al*, 2010; Sin *et al*, 2004; Tobo *et al*, 2007)。

4. GPR4 の機能

4.1. LPC, SPC と GPR4 機能

LPC が GPR4 を介して、ヒト脳微小血管内皮細胞 (human brain microvascular endothelial cells; HBMEC) における、低分子 G タンパク質ファミリーに属する RhoA の活性化による血管外への単球の遊出に関与する (Huang *et al*, 2007)。GPR4 が LPC による血管内皮細胞のバリア機能の減弱や、血管内皮細胞のアクチンのリモデリングに関与する (Qiao *et al*, 2006)。また GPR4 が LPC によるラット血管内皮細胞 YPEN-1 における接着分子 VCAM-1 や P-セレク

チンの発現増加に関与すること (Zou *et al*, 2007) が報告されている。一方、SPC に関しても、SPC による血管新生に GPR4 が関与すること (Kim *et al*, 2005) が報告されている。

4.2. プロトンと GPR4 機能

哺乳類の生体内の pH は 7.4 前後の狭い範囲で厳密に制御されている。しかしながら、骨のリモデリング、肺や腎臓からの酸排出などの生理作用や、虚血や細菌感染などに起因する炎症反応では、局所的な pH の低下が観察される (Hunt *et al*, 2000; Lipton, 1999; Pezzulo *et al*, 2012)。またがんにおいては、がん細胞自身の解糖系の亢進により、がん組織の内部やその周辺の pH が低下する (Griffiths, 1991)。炎症時には防御応答として、白血球の炎症部への遊走、浸潤が引き起こされる。この pH の低下が免疫細胞の増殖、遊走、またがん細胞自身やがん組織への血管新生に影響を与えていると考えられるが、その標的や分子メカニズムに関しては、ほとんど明らかとなっていない。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) には GPR4 が発現している。細胞外 pH を低下させると HUVEC では、GPR4/G_s/AC/cAMP 系を介して増加した cAMP が、グアニンスクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor; GEF) である Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) を介して、ヒトリンパ腫由来単芽球様細胞株 U937 との細胞接着を促進させること (Chen *et al*, 2011) が報告されている。また、HUVEC に発現するケモカイン、サイトカインや接着分子などの炎症関連性因子の mRNA 量が、細胞外 pH の低下に伴い GPR4 を介して増加すること (Dong *et al*, 2013) が報告されている。B16F10 メラノーマ細胞や TRAMP-C1 前立腺がん由来細胞には GPR4 が発現している。細胞外 pH を低下させるとこれらの細胞の遊走、浸潤活性が低下する。また、この遊走、浸潤活性の低下は、これらの細胞に GPR4 を過剰発現させると増大したことから、GPR4 を介した応答であることの報告がなされている (Castellone *et al*, 2011)。

4.3. リガンドが不明な GPR4 機能

細胞レベルでは NIH3T3 細胞に GPR4 を過剰発現させると、がん細胞の特徴の一つであるフォーカスが形成される (Sin *et al*, 2004)。マウスを用いて *in vivo* での GPR4 の機能を解析した報告も、以下のようにいくつかなされている。

GPR4 を過剰発現させた B16F10 メラノーマ細胞を注入した野生型 (C57BL/6) マウスでは、コントロールとして発現ベクターを組み込んだ B16F10 を注入したマウスに比べて、メラノーマ細胞の肺への転移が約 80% 抑制されたことから、GPR4 がメラノーマの転移抑制に機能するとの結果が得られている (Castellone *et al*, 2011)。GPR4 欠損マウスでは野生型 (Balb/C) マウスに比べて、がんの特徴的である血管新生が減少する (Wyder *et al*, 2011)。また GPR4 欠損マウスの胎仔の一部には出血が観察され、胎仔の数も野生型に比べておよそ 30% 少ない (Yang *et al*, 2007)。これらの報告は GPR4 が血管新生やがんの機能に関与していることを示している。

GPR4 の生理的役割もいくつか報告されている。GPR4 欠損マウスでは腎臓からの酸の排出が減少することから、酸塩基平衡の維持に GPR4 が関与している (Sun *et al*, 2010)。また GPR4 欠損マウスでは、インスリン抵抗性が改善されている (Giudici *et al*, 2013)。この結果は、これまで予想されていなかった GPR4 の内分泌機能への関与という点で、今後の進展に興味を持たれる。

このようにこれまでのマウスの解析により、GPR4 が各種生理、病態生理的役割を担っていることが、明らかとなりつつある。しかしながら、これら *in vivo* で得られた結果が、GPR4 へのプロトン作用によるものか、LPC や SPC 作用によるものか、または未知の因子によるものかに関しては、不明である。

5. GPR4 とゼブラフィッシュ

in vivo での GPR4 の機能解析は前述したように、これまでマウスが使用されてきた。しかしながら、マウスは生きたまま外部から組織などの内部を観察することは容易ではない。また LPC、SPC やプロトンな

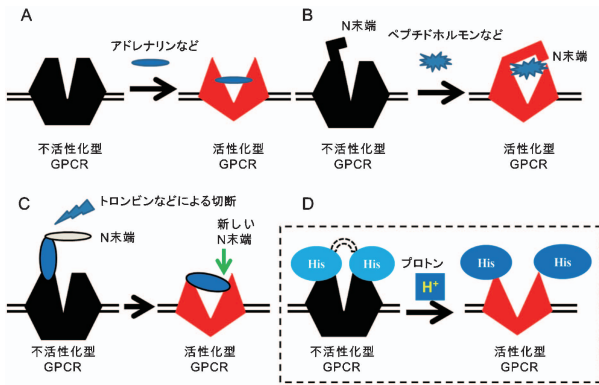


図1 GPCRの活性化様式

アドレナリンなどの低分子の刺激分子は GPCR 内部に結合することで、GPCR を活性化型に変化させる (A)。ペプチドホルモンなど高分子の刺激分子は GPCR の N 末端部分と GPCR の細胞表面部分に結合することで、GPCR を活性化型に変化させる (B)。トリプシンなどプロテアーゼにより活性化される GPCR は、そのプロテアーゼにより N 末端部分が切断された結果、新たに露出した N 末端部分が刺激分子として GPCR に結合することで、活性化型に変化する (C)。GPR4 などプロトンを感じ取る GPCR は上記 A-C のどのタイプとも異なり、GPCR の細胞表面に存在する特異的なヒスチジン残基間の水素結合をプロトンが切断することにより、GPCR の立体構造が自動的に活性化型に変化する (D)。詳細は本文参照。

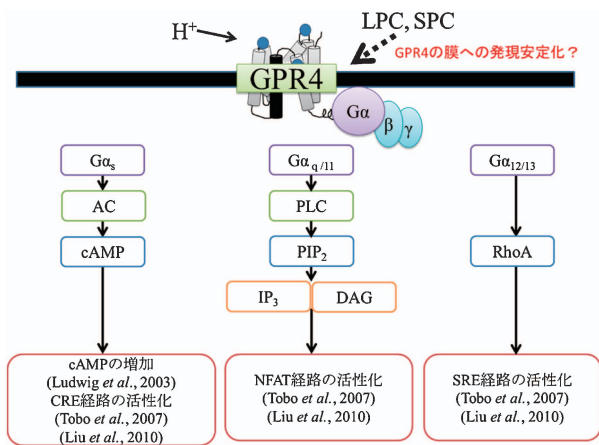


図2 GPR4 を介して活性化されるシグナル伝達系

GPR4 は LPC や SPC などの脂質により、また細胞外 pH の低下に伴うプロトン濃度の増加により活性化され、 G_s /cAMP 系、 $G_{q/11}$ /IP₃ 系、 $G_{12/13}$ /Rho 系にシグナルを伝える。詳細は本文参照。

略語一覧

AC: adenylylcyclase, cAMP: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, DAG: diacylglycerol, IP₃: inositol trisphosphate, PI(4,5)P₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PLC: phospholipase C, LPC: lysophosphatidylcholine, SPC: sphingosylphosphorylcholine

どの物質や薬物を、ある特定のタイミングで簡単に投与することも困難である。このような実験上の問題を解決するために、ゼブラフィッシュが新たな脊椎動物

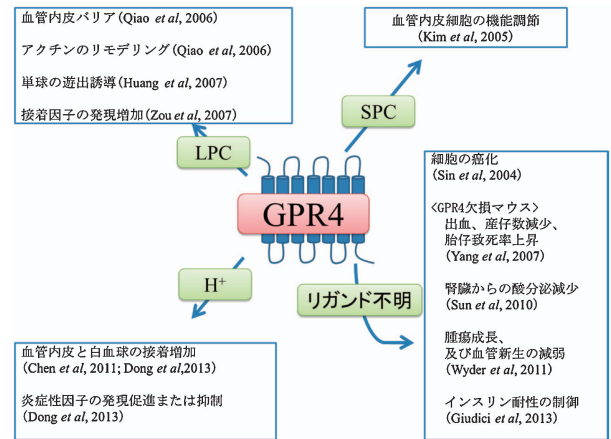


図3 各種刺激により引き起こされる GPR4 応答のまとめ

モデル動物として注目されている。

ゼブラフィッシュは胚が透明なため、各種蛍光融合タンパク質を用いて生きたままでの *in vivo* イメージングが可能である (Lawson & Weinstein, 2002)。また飼育水に目的の物質や薬物を溶かすことで簡単に特定のタイミングでこれらを投与することが可能である。加えて、個体レベルで特定遺伝子の過剰発現 (Kawakami *et al*, 2004) や特定遺伝子の欠損 (Hwang *et al*, 2013) が行えることや、また各種病態モデルがすでに利用可能であること (Lieschke & Currie, 2007) から、マウスでは明らかにできなかった部分の GPR4 の機能解析が進む可能性がある。

ゼブラフィッシュの GPR4 ホモログとヒト GPR4 のアミノ酸の相同性は 74% である。最近我々はこのゼブラフィッシュ GPR4 ホモログがヒトやマウス GPR4 と同様に、プロトンにより活性化することを見出した (Mochimaru *et al*, 2015)。がん転移や血管形成に関しても、ゼブラフィッシュではマウスと同様の結果が得られることが、他の受容体や生理活性物質を用いて示されている (Lee *et al*, 2008; Teng *et al*, 2013; Yukiura *et al*, 2011)。ゼブラフィッシュを用いた今後の GPR4 の研究の発展は、まだ明らかとなっていない GPR4 の機能の解明に寄与することが期待される。

6. おわりに

GPR4 はこれまでの GPCR とは異なったユニーク

なりガンド特異性や活性化様式を有している。そしてこれまでに、そのリガンドと機能の研究が図3に示すようになされてきた。しかしながら依然として、LPCやSPCといった脂質との関係や個体レベルで作用しているGPR4のリガンドの探索など、まだ解決されるべき問題が数多く存在する。これらの問題を明らかにすることは、GPR4を介した新たな生体調節機構や、がんなどの疾患に対する新たな制御機構の解明に繋がる可能性がある。今後、ゼブラフィッシュといった新たな実験モデルを取り入れることで、GPR4の活性化機構、生理的、病態生理的機能の解明が進むことが期待される。

参考文献

- Bektas M, Barak LS, Jolly PS, Liu H, Lynch KR, Lacana E, Suhr KB, Milstien S, Spiegel S (2003) The G protein-coupled receptor GPR4 suppresses ERK activation in a ligand-independent manner. *Biochemistry* 42: 12181–12191
- Castellone RD, Leffler NR, Dong L, Yang LV (2011) Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. *Cancer Lett* 312: 197–208
- Chen A, Dong L, Leffler NR, Asch AS, Witte ON, Yang LV (2011) Activation of GPR4 by acidosis increases endothelial cell adhesion through the cAMP/Epac pathway. *PLoS One* 6: e27586
- Dong L, Li Z, Leffler NR, Asch AS, Chi JT, Yang LV (2013) Acidosis activation of the proton-sensing GPR4 receptor stimulates vascular endothelial cell inflammatory responses revealed by transcriptome analysis. *PLoS One* 8: e61991
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256–1272
- Giudici L, Velic A, Daryadel A, Bettoni C, Mohebbi N, Suply T, Seuwen K, Ludwig MG, Wagner CA (2013) The proton-activated receptor GPR4 modulates glucose homeostasis by increasing insulin sensitivity. *Cell Physiol Biochem* 32: 1403–1416
- Griffiths JR (1991) Are cancer-cells acidic? *British Journal of Cancer* 64: 425–427
- Huang F, Mehta D, Predescu S, Kim KS, Lum H (2007) A novel lysophospholipid- and pH-sensitive receptor, GPR4, in brain endothelial cells regulates monocyte transmigration. *Endothelium* 14: 25–34
- Hunt JF, Fang KZ, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TAE, Gaston B (2000) Endogenous airway acidification—Implications for asthma pathophysiology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161: 694–699
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31: 227–229
- Ishii S, Kihara Y, Shimizu T (2005) Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 280: 9083–9087
- Katada T (2012) The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biol Pharm Bull* 35: 2103–2111
- Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N, Mishina M (2004) A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental Cell* 7: 133–144
- Kim KS, Ren J, Jiang Y, Ebrahem Q, Tipps R, Cristina K, Xiao YJ, Qiao J, Taylor KL, Lum H, Anand-Apte B, Xu Y (2005) GPR4 plays a critical role in endothelial cell function and mediates the effects of sphingosylphosphorylcholine. *FASEB J* 19: 819–821
- Lawson ND, Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental Biology* 248: 307–318
- Lee S-J, Chan T-H, Chen T-C, Liao B-K, Hwang P-P, Lee H (2008) LPA(1) is essential for lymphatic vessel development in zebrafish. *Faseb Journal* 22: 3706–3715
- Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8: 353–367
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79: 1431–1568
- Liu JP, Nakakura T, Tomura H, Tobo M, Mogi C, Wang JQ, He XD, Takano M, Damirin A, Komachi M, Sato K, Okajima F (2010) Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. *Pharmacol Res* 61: 499–505
- Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425: 93–98
- Mochimaru Y, Azuma M, Oshima N, Ichijo Y, Satou K, Matsuda K, Asaoka Y, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H (2015) Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish. *Biochem Biophys Res Commun* 457: 493–499
- Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T (2004) G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 279: 42484–42491
- Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, Banfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB, Welsh MJ, Zabner J (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 487: 109–113
- Qiao J, Huang F, Naikawadi RP, Kim KS, Said T, Lum H (2006) Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L91–101
- Ren J, Zhang Y, Cai H, Ma H, Zhao D, Zhang X, Li Z, Wang S, Wang J, Liu R, Li Y, Qian J, Wei H, Niu L, Liu Y, Xiao L, Ding M, Jiang S (2014) RNAi targeting GPR4 influences

- HMEC-1 gene expression by microarray analysis. *Int J Clin Exp Med* 7: 607–615
- Sin WC, Zhang Y, Zhong W, Adhikarakunnathu S, Powers S, Hoey T, An S, Yang J (2004) G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers. *Oncogene* 23: 6299–6303
- Sun X, Yang LV, Tiegs BC, Arend LJ, McGraw DW, Penn RB, Petrovic S (2010) Deletion of the pH sensor GPR4 decreases renal acid excretion. *J Am Soc Nephrol* 21: 1745–1755
- Svoboda P, Teisinger J, Novotny J, Bourova L, Drmota T, Hejnova L, Moravcova Z, Lisy V, Rudajev V, Stohr J, Vokurkova A, Svandova I, Durchankova D (2004) Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiological Research* 53: S141–S152
- Teng Y, Xie X, Walker S, White DT, Mumm JS, Cowell JK (2013) Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *Bmc Cancer* 13
- Tobo M, Tomura H, Mogi C, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Kimura T, Murata N, Kurose H, Sato K, Okajima F (2007) Previously postulated “ligand-independent” signaling of GPR4 is mediated through proton-sensing mechanisms. *Cell Signal* 19: 1745–1753
- Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Murata N, Kimura T, Kuwabara A, Wakamatsu K, Koizumi H, Uede T, Tsujimoto G, Kurose H, Sato T, Harada A, Misawa N, Tomura H, Okajima F (2004) TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 279: 45626–45633
- Wang L, Radu CG, Yang LV, Bentolila LA, Riedinger M, Witte ON (2005) Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A. *Molecular Biology of the Cell* 16: 2234–2247
- Wyder L, Suply T, Ricoux B, Billy E, Schnell C, Baumgarten BU, Maira SM, Koelbing C, Ferretti M, Kinzel B, Müller M, Seuwen K, Ludwig MG (2011) Reduced pathological angiogenesis and tumor growth in mice lacking GPR4, a proton sensing receptor. *Angiogenesis* 14: 533–544
- Xu Y (2002) Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1582: 81–88
- Yang LV, Radu CG, Roy M, Lee S, McLaughlin J, Teitell MA, Iruela-Arispe ML, Witte ON (2007) Vascular abnormalities in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR4 that functions as a pH sensor. *Mol Cell Biol* 27: 1334–1347
- Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira S, Arima N, Inoue A, Hashimoto T, Arai H, Kawahara A, Nishina H, Aoki J (2011) Autotaxin Regulates Vascular Development via Multiple Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptors in Zebrafish. *Journal of Biological Chemistry* 286: 43972–43983
- Zou Y, Kim CH, Chung JH, Kim JY, Chung SW, Kim MK, Im DS, Lee J, Yu BP, Chung HY (2007) Upregulation of endothelial adhesion molecules by lysophosphatidylcholine. Involvement of G protein-coupled receptor GPR4. *FEBS J* 274: 2573–2584
- 大嶋菜月, 一條祐太, 持丸雄太, 佐藤一裕, 戸村秀明 (2014) G タンパク質共役型受容体の活性化機構. 明治大学農学部研究報告, Vol. 63, pp. 103–110